

## Physicochemical Properties and Cellular Responses of Various Amounts of Strontium-Doped Gypsum Bioceramics

H. Bandegani<sup>1</sup>, S. Hesaraki<sup>2\*</sup>, M. Alizadeh<sup>3</sup>

<sup>1</sup> M.Sc Student of Materials Engineering, Ceramics Department, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran, hadis.bandegani@gmail.com

<sup>2</sup> Assistant Professor, Ceramics Department, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran

<sup>3</sup> Assistant Professor, Ceramics Department, Materials and Energy Research Center, Karaj, Iran, m-alizadeh@merc.ac.ir

---

### Abstract

The aim of the present paper is to investigate the effect of incorporating various amounts of strontium ions (0.19 - 2.23 wt%) into calcium sulfate bioceramics on the physical, structural properties and in vitro bioactivity and compare these properties with those of a pure calcium sulfate dehydrate (gypsum) as control. Strontium-doped gypsum (Sr-gypsum) was obtained by mixing calcium sulfate hemihydrates powder and solutions of strontium nitrate followed by washing the specimens with distilled water for the removal of residual salts. Gypsum was the only phase found in the composition of both pure and Sr-gypsum meanwhile a shift into lower diffraction angles was observed in the x-ray diffraction patterns of doped specimens. The Sr-doped samples exhibited higher compressive strength and lower solubility than pure gypsum. Microstructure of all gypsum specimens had been composed of many rod-like small crystals entangled to each others with more elongation and higher thickness in the cases of Sr-gypsum. EDXA pattern of Sr-gypsum showed the presence of calcium and sulfur ions as the main elements of gypsum as well as slight amount of strontium ion. A continuous release of strontium was observed from the Sr-gypsum after soaking in simulated body fluid for 14 days. Proliferation rate of cultured osteoblasts and higher alkaline phosphatase activity on doped samples was better compared to pure gypsum.

**Keywords:** Strontium, Bioceramics, in vitro, Gypsum, Sr-containing calcium sulfate, Osteoblasts proliferation.

---

\* Corresponding author

Address: Saeed Hesaraki, Ceramics Department, Materials and Energy Research Center, Postal Code: 31787/316, Meshkin Dasht, Karaj, Iran  
Tel: +98 261 6204131-4  
Fax: +98 261 6201888  
E-mail: s-hesaraki@merc.ac.ir

## بررسی خواص فیزیکی، شیمیایی و پاسخ‌های سلولی بیوسرامیک ژپس حاوی غلظت‌های مختلف استرانسیم

حدیث بندگانی<sup>۱</sup>، سعید حصارکی<sup>۲\*</sup>، مسعود علیزاده<sup>۳</sup>

<sup>۱</sup> دانشجوی کارشناسی ارشد، پژوهشکده سرامیک، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج [hadis.bandegani@gmail.com](mailto:hadis.bandegani@gmail.com)

<sup>۲</sup> استادیار، گروه فناوری، پژوهشکده سرامیک، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج

<sup>۳</sup> استادیار، گروه فناوری، پژوهشکده سرامیک، پژوهشگاه مواد و انرژی، کرج [m-alizadeh@merc.ac.ir](mailto:m-alizadeh@merc.ac.ir)

### چکیده

هدف این مقاله بررسی اثر وارد کردن مقادیر مختلف یون استرانسیم (با درصد وزنی ۰/۱۹-۲/۲۳) به درون شبکه بیوسرامیک سولفات کلسیم بر خواص فیزیکی، ساختاری و زیستی در محیط *in vitro* و مقایسه آن با خواص نمونه سولفات کلسیم دی هیدراته (ژپس) خالص به عنوان نمونه شاهد است. ژپس حاوی استرانسیم (Sr-ژپس) از مخلوط کردن پودر سولفات کلسیم نیمه هیدراته و محلول نترات استرانسیم حاصل شد، سپس نمونه‌ها با آب مقطر شستشو داده شدند تا نمک‌های باقیمانده خارج شود. ژپس تنها فازی بود که در ترکیب نمونه ژپس خالص و استرانسیم‌دار حاصل شد و همچنین یک جابه‌جایی در زاویه پراش اشعه X به سمت زوایای کوتاه‌تر در الگوهای پراش نمونه‌های حاوی استرانسیم مشاهده شد. حضور استرانسیم در ساختار ژپس استحکام ژپس را افزایش و حلالیتش را کاهش داد. ریزساختار تمامی نمونه‌ها شامل بلورهای کوچک میله‌ای شکل و درهم فرو رفته است و در این میان بلورهای Sr-ژپس طول‌تر و ضخیم‌ترند. الگوی EDXA نمونه ژپس حاوی استرانسیم حضور یون‌های کلسیم و سولفور به عنوان عناصر اصلی ژپس و مقدار جزئی استرانسیم را نشان داد. رهایش پیوسته استرانسیم از نمونه ژپس حاوی استرانسیم به درون محلول شبیه‌سازی شده با بدن به مدت ۱۴ روز مشاهده شد. نرخ تکثیر و فعالیت آکالین فسفات سلول‌های استخوان‌ساز کشت داده شده روی نمونه‌های حاوی Sr نسبت به ژپس خالص بهتر بود.

کلیدواژگان: استرانسیم، بیوسرامیک، *in vitro*، ژپس، سولفات کلسیم حاوی استرانسیم، تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز.

\*عهددار مکاتبات

نشانی: کرج، مشکین دشت، پژوهشگاه مواد و انرژی، پژوهشکده سرامیک، صندوق پستی ۳۱۷۸۷/۳۱۶

تلفن: ۴-۰۲۶۱-۶۲۰۴۱۳۱، دورنگار: ۰۲۶۱-۶۲۰۱۸۸۸، پیام‌نگار: ۰۲۶۱-۶۲۰۱۸۸۸، [s-hesaraki@merc.ac.ir](mailto:s-hesaraki@merc.ac.ir)

## ۱- مقدمه

عنوان پوشش با اسپری شدن به وسیله پلاسما استفاده و پاسخ سلولی مطلوبی در مقایسه با لایه هیدروکسی آپاتیت خالص مشاهده شد [۱۴]. همچنین وارد شدن استرانسیم به درون ترکیب شیشه‌های زیست‌فعال به وسیله برخی محققان گزارش شده است. ابونیل<sup>۲</sup> و همکاران خواص فیزیکی و ساختاری شیشه‌های ذوبی پایه فسفاتی و همچنین اثر مثبت شیشه‌های حاوی استرانسیم روی زیست‌سازگاری سلول‌های استخوان‌ساز انسان را گزارش کردند [۱۵]. خواص فیزیکی-شیمیایی و سلولی در محیط *in vitro* در شیشه‌های زیست‌فعال سل-ژل بر پایه سیستم  $\text{CaO-SrO-SiO}_2\text{-P}_2\text{O}_5$  به وسیله حصارکی و همکاران گزارش شد [۱۶]. سولفات کلسیم ماده‌ای زیست‌سازگار با سرعت جذب بالاست که سال‌ها در پزشکی و دندانپزشکی برای درمان استخوان و عیوب دندانی به کار گرفته شده است. سولفات کلسیم می‌تواند به عنوان ماده مکمل، پرکننده فضا و وسیله‌ای برای رهایش کنترل شده داروهای خاص استفاده شود [۱۷-۱۹]. تجربه‌های پزشکی مثبتی از استفاده سولفات کلسیم در فرایند جانشینی استخوان در دسترس است [۲۰]. ژپس<sup>۳</sup> به شکل سولفات کلسیم دی‌هیدراته ( $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ) از گچ پاریس، سولفات کلسیم نیمه‌هیدراته ( $\text{CaSO}_4 \cdot 1/2\text{H}_2\text{O}$ )، سنتز می‌شود. ژپس شامل ریزساختاری با تعداد زیادی بلورهای کوچک و قرار گرفته در کنار هم، محیط بسیار مناسبی برای ترمیم استخوان فراهم می‌کند. بیان شده است که ژپس فقط یک ماده غیرفعال و مشوق استخوان‌سازی نیست بلکه می‌تواند بر اساس ساختار بلوری خاص و غلظت کلسیم بالای آن، قابلیت استخوان‌سازی را داشته باشد [۲۱]. هدف این مقاله وارد کردن غلظت‌های مختلف استرانسیم به درون ژپس و بررسی اثر این جانشینی روی خواص فیزیکی-شیمیایی، ساختاری و سلولی این ماده در محیط *in vitro* است.

## ۲- مواد و روش‌ها

## ۲-۱- مواد اولیه و نحوه تهیه نمونه‌های ژپس

مواد اولیه استفاده شده در این مطالعه  $\alpha$ -سولفات کلسیم نیمه‌هیدراته ( $\alpha$ -CSH، آلدريج<sup>۴</sup>، آمریکا)، نترات استرانسیم

به دلیل اینکه استرانسیم از نظر شیمیایی و فیزیکی شبیه کلسیم است، این عنصر بسته به موقعیت استخوان به‌طور جزئی در اسکلت و به‌طور ترجیحی در استخوان وجود دارد. میزان حضور Sr به ترتیب در استخوان ران، مهره‌های ستون فقرات و استخوان لگن افزایش می‌یابد [۱]. نمک‌های استرانسیم به عنوان محرک‌های استخوان‌سازی و جلوگیری کننده از بازجذب شدن استخوان در آزمایش‌های *in vitro* و *in vivo* یافت شده‌اند [۲]. اخیراً داروهای حاوی استرانسیم برای درمان پوکی استخوان پیشنهاد شده‌اند [۳]. همچنین، زمانی که نه نمک‌های کلسیم و نه نمک‌های سدیم مؤثر بودند، اثرات محرک‌سازی استرانسیم بر کلاژن استخوانی در کشت سلولی گزارش شده‌اند [۴]. در دهه گذشته، محدوده وسیعی از بیوسرامیک‌ها از قبیل هیدروکسی آپاتیت، تری فسفات کلسیم، اکتا فسفات کلسیم و شیشه‌های زیست‌فعال<sup>۱</sup> برای کاربردهای ارتوپدی نظیر پرکننده‌ها و سیمان‌های استخوانی، جانشین استخوان، داربست مهندسی بافت استخوان و شبکه تحویل دارو برای درمان التهاب موضعی استخوان مطالعه شده‌اند [۵-۷]. به دلیل اثرات مفید استرانسیم در درمان بیماری‌های مربوط به استخوان و عیوب استخوانی، بسیاری از مطالعات بر روی سنتز، مشخصه‌یابی و مطالعات بیوسرامیک‌های حاوی استرانسیم روی حیوانات متمرکز بودند. مطالعات مختلفی هم در مورد وارد کردن Sr به داخل شبکه فسفات‌های کلسیم‌دار حتی تحت سنتز دما بالا [۸] یا به وسیله رسوب طی واکنش گیرش سیمان هیدروکسی آپاتیت انجام گرفته است [۹]. هیدروکسی آپاتیت حاوی استرانسیم به عنوان ماده پرکننده استخوان تهیه شده است و به شکل مخلوط با سیمان استخوان استفاده می‌شود [۱۰، ۱۱] تا پیوستگی سلول‌های استخوان‌ساز و تبدیل به حالت معدنی در محیط *in vitro* [۱۲] و همچنین رشد استخوان و یکپارچگی استخوان را در محیط *in vivo* [۱۳] بهبود بخشد.  $\beta$ -تری فسفات کلسیم سنتز شده به عنوان عملگر سیمان فسفات کلسیم با رهایش یون  $\text{Sr}^{2+}$  در محدوده ۱۲-۳۰ ppm استفاده شد. هیدروکسی آپاتیت حاوی Sr به

<sup>1</sup> Bioactive<sup>2</sup> Abou Neel<sup>3</sup> Gypsum<sup>4</sup> Aldrich

نرخ پویش  $2\theta/s$  ۰/۰۲ شناسایی شد. به این منظور وزن یکسانی از هر نمونه به شکل پودر به واحد XRD انتقال داده شد.

برای بررسی ویژگی ساختاری نمونه‌ها، اسپکتروسکوپی FTIR<sup>۱</sup> با پودر KBr به عنوان استاندارد استفاده شد. دیسک نمونه برابر ۱۰(w/w) تهیه شد. طیف‌های FTIR نمونه‌ها در محدوده  $4000-400\text{ cm}^{-1}$  با وضوح  $2\text{ cm}^{-1}$  جمع‌آوری شد. ساختار نمونه‌های ژپیس و Sr-ژپیس به کمک میکروسکوپ الکترونی روبشی<sup>۱۱</sup> (SEM) (تسکان، وگا II، XMU<sup>۱۲</sup>) مجهز شده با EDX<sup>۱۳</sup> و ولتاژ شتاب‌دهنده اعمالی ۴۰kV مشاهده شد. چگالی پودر نمونه‌ها با استفاده از دستگاه پیکنومتر گازی<sup>۱۴</sup> (آکیویک ۱۳۳۰، میکرومتریک<sup>۱۵</sup>) اندازه‌گیری شد. برای این منظور، نمونه‌های سخت و خشک شده پودر شدند و بعد از عبور از الک با مش ۲۳۰ شناسایی شدند. برای درک اثر یون‌های  $\text{Sr}^{+2}$  وارد شده به درون ژپیس بر استحکام مکانیکی، نمونه‌های استوانه‌ای Sr-ژپیس (به قطر ۶mm و ارتفاع ۱۲mm) در قالب تفلونی ساخته شد. این نمونه‌ها در محلول SBF به مدت ۲۴h نگهداری شدند و سپس استحکام فشاری آنها در حالت تر با استفاده از دستگاه آزمایش یونیورسال<sup>۱۶</sup> (زوئیک/روئل<sup>۱۷</sup>، HCR ۲۵/۴۰۰) با سرعت پیستون ۱mm/min ثبت شد. محلول SBF با ترکیب شیمیایی مشابه پلاسما خون انسان با انحلال واکنشگرهای شیمیایی در آب مقطر، باف<sup>۱۸</sup> کردن آن در تریس- آمینو متان هیدروکسی متیل<sup>۱۹</sup> و تنظیم pH ۷/۴ با استفاده از اسید هیدروکلریک آماده شد [۲۲].

(مرک<sup>۵</sup>، آلمان) و محلول شبیه‌سازی سیالات بدن<sup>۶</sup> (SBF) است. بیوسرامیک‌های ژپیس حاوی استرانسیم (Sr-ژپیس) از فرایند گیرش سولفات کلسیم نیمه‌هیدراته تهیه شدند. سولفات کلسیم نیمه‌هیدراته با محلول آبی نترات استرانسیم به نسبت جامد به مایع ۲g/mL مخلوط شد، سپس خمیر به دست آمده به درون قالب تفلونی دیسکی شکل (به قطر ۱۰mm و ارتفاع ۳mm) ریخته شد تا گیرش یابد. غلظت‌های متفاوت نترات استرانسیم استفاده شد تا به محصول ژپیس با غلظت‌های متفاوت یون‌های حاوی استرانسیم برسیم. همچنین از آب مقطر خالص برای تهیه ژپیس عاری از یون اضافی (Sr) به عنوان نمونه شاهد (G-۰) استفاده شد. در جدول ۱ جزئیات فرمولاسیون متفاوت خمیرها برای آماده‌سازی ژپیس حاوی Sr به همراه نام تعیین شده ارائه شده است.

وقتی خمیرها به‌طور کامل سخت شدند (گیرش یافتند)، نمونه‌ها از قالب بیرون آورده شده و در انکوباتور با رطوبت ۱۰۰٪ در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۲۴h قرار داده شدند. همچنین چندین بار با آب مقطر شسته شدند تا افزودنی نترات وارد شده احتمالی خارج و در نهایت در دمای اتاق به مدت ۷۲h خشک شدند.

## ۲-۲- ارزیابی خواص

غلظت یون‌های استرانسیم در نمونه‌های ژپیس حاوی Sr به کمک روش ICP-AES<sup>۷</sup> (ARL 3410) اندازه‌گیری شد. ترکیب فازی نمونه‌ها به کمک پراش اشعه-X (XRD<sup>۸</sup>، فیلیپس<sup>۹</sup>، PW 3710) با تابش  $\text{Cu-K}\alpha$ ، ولتاژ اعمالی ۴۰kV و

جدول ۱- جزئیات فرمولاسیون متفاوت خمیرها برای آماده‌سازی ژپیس حاوی Sr به همراه نام تعیین شده

نام نمونه					
G-Sr۴	G-Sr۳	G-Sr۲	G-Sr۱	G-۰	
۲/۵	۱/۲۵	۰/۵	۰/۲۵	۰	مقدار Sr موجود در ژپیس
۱۴/۰۸	۷/۰۴	۲/۸۰	۱/۳۶	۰	غلظت محلول $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ مورد استفاده به عنوان فاز مایع در خمیر (%)
$\alpha$ -CHS	$\alpha$ -CHS	$\alpha$ -CHS	$\alpha$ -CHS	$\alpha$ -CHS	فاز جامد خمیر

<sup>5</sup> Merck

<sup>8</sup> X-Ray Diffraction

<sup>11</sup> Scanning Electron Microscopy

<sup>14</sup> Gas pycnometer

<sup>17</sup> Zwick/Roell

<sup>6</sup> Simulated Body Fluid

<sup>9</sup> Philips

<sup>12</sup> Tescan, VEGA II XMU

<sup>15</sup> Accupyc 1330, Micromeritics

<sup>18</sup> Buffer

<sup>7</sup> Inductively Coupled Plasma- Atomic Emission Spectroscopy

<sup>10</sup> Fourier-Transform InfraRed

<sup>13</sup> Energy Dispersive X-ray Analysis

<sup>16</sup> Universal

<sup>19</sup> Tris (Hydroxy methyl) Aminomethane

در انکوباتور مرطوب در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  با ۹۵٪ هوا و ۵٪ دی‌اکسید کربن به مدت ۱، ۳ و ۷ روز کشت داده شد. بعد از هر دوره، از محیط خارج و ۲ ml محلول MTT، ۳- (۵ و ۴) دی‌اتیل تیزول-۲-۵- دی‌فنیل برومید تترازولیم به هر چاهک اضافه شد. قرار گرفتن دوباره نمونه‌ها در انکوباتور در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  به مدت ۴ h در اتمسفر کاملاً مرطوب ۵٪ دی‌اکسید کربن / ۹۵٪ هوا انجام شد، سپس MTT به وسیله سلول‌های فعال جذب شد و در میتوکندری به گرانون‌های فورمازان ارغوانی غیرقابل حل تبدیل یافت. متعاقباً، محیط دور انداخته و فورمازان رسوب داده شده در دی‌متیل سولفوکسید ( $\text{DMSO}^{25}$ )، ۱۵۰ ml/well، حل شد و چگالی نوری<sup>۲۶</sup> (OD) محلول با استفاده از اسپکترومتر دارای بشقاب‌های ریز (BIO-TEK Elx ۸۰۰۰، های‌لند پارک<sup>۲۷</sup>، آمریکا) با طول موج ۵۷۰ nm خوانده شد. چگالی نوری با طول موج ۵۹۰ nm استفاده از دستگاه خواننده بشقاب‌های ریز چند چاهکی (ICN، سوئیس) اندازه‌گیری شد. فعالیت سلول‌های استخوان-ساز با تولید آنزیم آلکالین فسفاتاز<sup>۲۸</sup> (ALP) از سلول‌های G-۲۹۲ اندازه‌گیری می‌شود. سلول‌ها روی نمونه‌ها در همان شرایط کشت توضیح داده شده در بالا جوانه‌زده و سطح فعالیت ALP طی ۱، ۳ و ۷ روز تعیین شد. سلول‌های تکثیر شده G-۲۹۲ حاصل تجزیه سلولی منجمد شده و سه بار گرم شده تا غشای سلولی از بین برود. فعالیت ALP در ۴۰۵ nm با استفاده از p- فسفات نیترو فنیل در بافر دی اتانول آمید به عنوان زیرپایه رنگ‌زا تعیین شد.

داده‌ها با استفاده از نرم افزار اکسل بررسی شد و نتایج به شکل میانگین  $\pm$  انحراف معیار استاندارد از حداقل ۴ آزمایش در نظر گرفته شد. اهمیت بین مقادیر میانگین اندازه‌گیری شده با استفاده از برنامه نرم افزاری استاندارد (SPSS) و  $p \leq 0.05$  تحلیل شد.

### ۳- نتایج و بحث

در این مطالعه ژئیس حاوی Sr با تبدیل شدن فاز سولفات کلسیم نیمه‌هیدراته به سولفات کلسیم دی‌هیدراته طی واکنش

حلالیت نمونه‌های ژئیس و Sr-ژئیس با غوطه‌وری نمونه دیسک‌شکل درون محلول SBF با نسبت جامد به مایع  $1/6 \text{ g}/100 \text{ ml}$  و اندازه‌گیری غلظت یون‌های Ca و Sr رها شده از نمونه‌ها به درون محلول (با استفاده از دستگاه ICP-AES) برحسب تابع زمان بررسی شد. بعد از هر دوره ارزیابی، حجم کل محلول SBF برای آنالیز خارج و نمونه سریعاً با محلول تازه پر شد. غلظت تجمعی هر یون به وسیله عبارت زیر محاسبه و برحسب زمان غوطه‌وری رسم شد:

$$[\text{Sr}]_n = \sum_{i=1}^{i=n} [\text{Sr}]_i$$

در اینجا  $[\text{Sr}]_n$  غلظت تجمعی یون‌های Sr در n امین بار دوره ارزیابی و i فاصله زمانی ارزیابی شده است. در این قسمت مطالعه از نمونه‌هایی با وزن یکسان استفاده شد.

تأثیر وارد شدن استرانسیم به درون بیوسرامیک ژئیس بر زیست‌سازگاری و فعالیت فسفات آلکالین سلول‌های استخوان‌ساز مطالعه شد و آزمایش‌های *in vitro* با استفاده از سلول‌های سرطانی انسانی (G-۲۹۲) انجام شده است. سلول‌ها در فلاسک‌های کشت بافت پلی استیرن (فالکون<sup>۲۰</sup>، آمریکا) در دمای  $37^{\circ}\text{C}$  تحت اتمسفر ۵٪ دی‌اکسید کربن در محیط DMEM<sup>۲۱</sup> با ال-گلوتامین، مکمل با ۱۰٪ سرم جنین گاوی<sup>۲۲</sup> (FBS) و آنتی بیوتیک آنتی میکوتیک<sup>۲۳</sup> (۱۰۰ واحد پنسیلین G سدیم، ۱۰۰ mg سولفات استروپتومایسین و ۰/۲۵ mg آموگوتریسین B در محلول نمک) کشت داده شدند و بعد از درمان با ۰/۰۵٪ آنزیم تریپسین-EDTA برداشت شدند.

تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز روی نمونه‌های ژئیس به روش MTT<sup>۲۴</sup> اندازه‌گیری شد. نمونه‌ها با ۷۰٪ اتانول استریل شدند و سپس  $3 \times 10^4$  عدد سلول در صفحه، بر روی آنها جوانه زد. دیسک‌های پلی استیرن با مساحت سطحی شبیه به نمونه‌های ژئیس از بشقاب کشت بافت تهیه و به طور مشابه به وسیله سلول‌ها به‌عنوان نمونه شاهد کشت شدند. ترکیب نمونه/سلول درون بشقاب‌های کشت ۲۴ چاهکی قرار گرفته و به مدت ۴ ساعت در انکوباتور گذاشته شد تا سلول‌ها فرصت کافی برای چسبیدن به نمونه‌ها داشته باشند. سپس، ۳ ml از محیط کشت به هر چاهک اضافه شد و ترکیب سلول/نمونه

<sup>20</sup> Falcon

<sup>23</sup> Antimycotic

<sup>26</sup> Optic Density

<sup>21</sup> Dulbecco's Modified Eagle's Medium

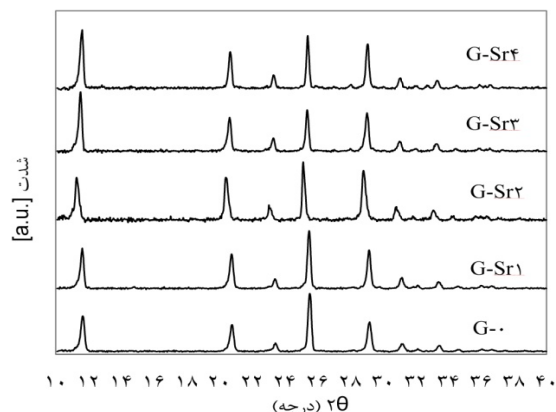
<sup>24</sup> 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide

<sup>27</sup> Highland Park

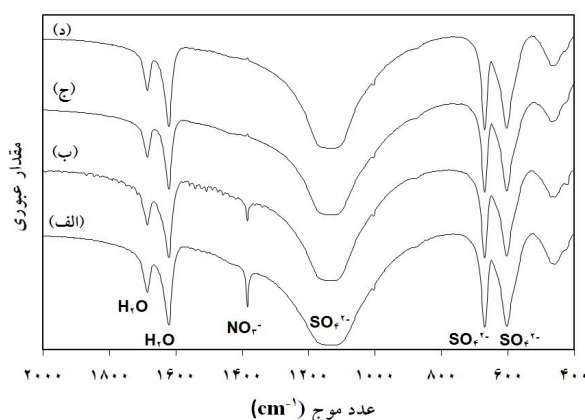
<sup>22</sup> Fetal Bovine Serum

<sup>25</sup> Dimethyl sulfoxide

<sup>28</sup> ALkaline Phosphatase



شکل ۱- الگوهای XRD نمونه‌های ژپیس با مقادیری Sr وارد شده



شکل ۲- طیف‌های FTIR ژپیس حاوی Sr (G-Sr4) بلافاصله بعد از گیرش (الف)، G-Sr4 بعد از شستشوی کوتاه مدت (ب)، G-Sr4 بعد از شستشوی یک روزه (ج)، ژپیس خالص (G-0) (د)

همچنین برای مقایسه، طیف نمونه G-Sr4 بعد از گیرش خمیر (کلسیم سولفات نیمه هیدراته/ محلول نیترات استرانسیم) و بعد از شستشو با آب مقطر تهیه شد. طیف FTIR پهنای ارتعاشی مرتبط با گروه‌های اصلی ترکیبات  $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (ژپیس)، یعنی گروه‌های  $\text{H}_2\text{O}$  و  $\text{SO}_4^{2-}$ ، را نشان می‌دهد که در شکل علامت گذاری شده است. دیگر طیف‌های FTIR نمونه‌های ژپیس حاوی Sr شبیه به طیف G-Sr4 بود که از آوردن آن صرف نظر شد. با یک شستشوی کوتاه مدت، شدت پیوندهای نیتراتی کاهش یافت و بعد از شستشوی کامل یک روزه، این پیوند ناپدید شد که نشان‌دهنده خروج کامل افزودنی‌های باقیمانده است. همان‌طور که نشان داده شده است، طیف Sr-ژپیس شبیه به طیف ژپیس خالص است و هیچ پیوند اضافی دیده نشد. در نهایت می‌توان نتیجه گرفت

هیدرولیک تهیه شد. سازوکار تشکیل ژپیس در جای دیگر [۲۳] بحث شده است. نمونه‌ها در اتمسفر ۱۰۰٪ رطوبت برای تکمیل شدن واکنش هیدرولیک و تبدیل فاز نیمه هیدراته اولیه به فاز دی هیدراته نگه داشته شد. سپس نمونه‌ها با آب مقطر شسته شد تا نیترات استرانسیم محلول باقیمانده در زمینه متخلخل تشکیل شده خارج شود. جدول ۲ غلظت عناصر Ca و Sr موجود در ترکیب ژپیس و Sr-ژپیس را نشان می‌دهد. غلظت Sr با افزایش مقدار نمک Sr دار افزایش یافت. غلظت مولی Sr در نمونه‌های Sr-ژپیس در محدوده ۰/۴-۵/۲ درصد مولی نسبت به Ca است. مقدار طبیعی Sr در اسکلت انسان تقریباً ۳/۵٪ مولی نسبت Ca است [۲۴]. بر این اساس نتایج می‌تواند توضیح دهد که چرا استرانسیم در غلظت‌های بیشتر از مقادیر انتخاب شده اضافه نشد.

شکل ۱ الگوهای XRD نمونه‌های سولفات کلسیم با مقادیر مختلف Sr را بعد از سخت شدن و شستشو با آب مقطر نشان می‌دهد. نمودار تمامی نمونه‌ها قله‌های تیز و باریک ژپیس را نشان می‌دهند و در این الگوها هیچ فاز دیگری پیدا نشد. آنالیز پراش اشعه X نمونه‌های Sr-ژپیس با افزایش جانشینی Sr یک جابه‌جایی در الگوی پراش به سمت زوایای پراش کوچک‌تر نشان می‌دهد و مشخص می‌سازد یون‌های Sr به درون ساختار بلورهای ژپیس وارد شده اند. در مقایسه با ژپیس خالص، الگوهای پراش اشعه X نمونه‌های ژپیس حاوی Sr نیز افزایشی در شدت قله‌ها در  $2\theta = 11/5^\circ$  نشان داد که این قله مطابق با صفحات بلوری (۰۲۰) و شاخص جهت ترجیحی رشد بلور ژپیس طی فرایند رسوب‌دهی است. طیف‌های FTIR ژپیس خالص و ژپیس حاوی Sr (G-Sr4) در شکل ۲ نشان داده شده است.

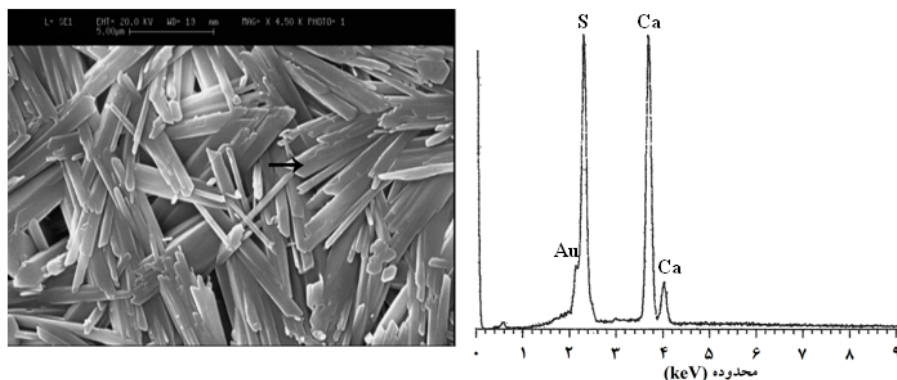
جدول ۲- درصد وزنی عناصر Sr و Ca در نمونه‌های ژپیس

حاوی Sr (اندازه‌گیری شده با روش ICP-AES)

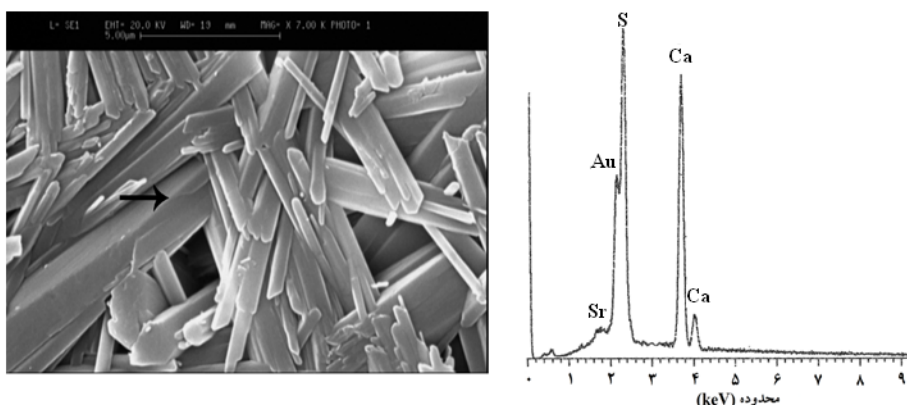
G-Sr4	G-Sr3	G-Sr2	G-Sr1	G-0	
۱۹/۷۹	۲۰/۱۸	۲۱/۶۵	۲۱/۷۹	۲۲/۱۱	Ca (%)
۲/۲۳	۱/۱۱	۰/۳۸	۰/۱۹	۰	Sr (%)

از لایه پوشش داده شده بر روی سطح را نشان می‌دهد. بلورهای میله‌ای شکل نمونه‌های ژئیس حاوی Sr (شکل ۴: G-Sr<sup>۱</sup>، شکل ۵: G-Sr<sup>۲</sup>، شکل ۶: G-Sr<sup>۴</sup>) نسبت به ژئیس خالص، درهم فرو رفتگی بیشتری را نشان می‌دهند. همچنین بلورهای Sr-ژئیس ضخیم‌تر از بلورهای ژئیس خالص‌اند.

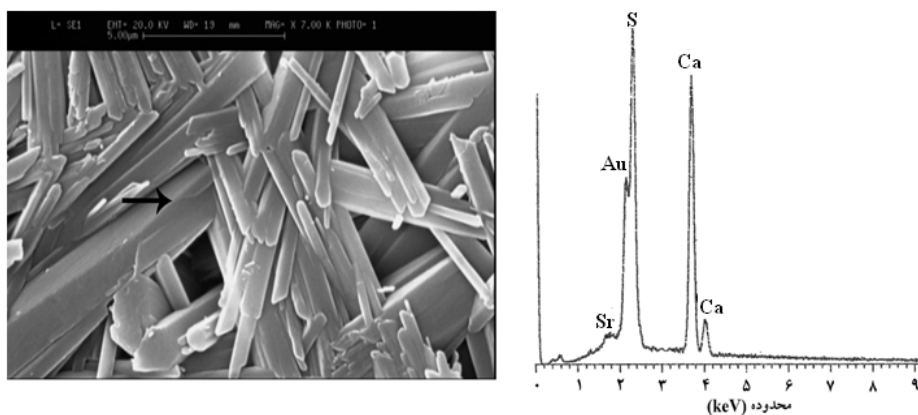
یون‌های Sr<sup>۲+</sup> به درون ساختار ژئیس وارد شده‌اند. تصاویر SEM نمونه‌ها به همراه الگوهای EDXA مطابق آن در شکل ۳ تا ۶ نشان داده شده است. ساختار ژئیس خالص (شکل ۳- سمت چپ) از بلورهای کوچک میله‌ای شکل درهم قفل شده تشکیل شده است و الگوی EDXA مطابق آن (شکل ۳- سمت راست) حضور کلسیم و سولفور به عنوان عناصر اصلی ژئیس و همچنین عنصر طلا (Au) حاصل



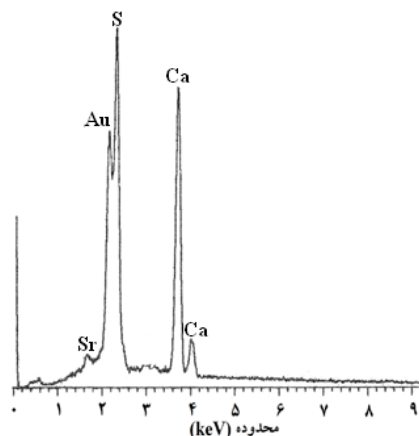
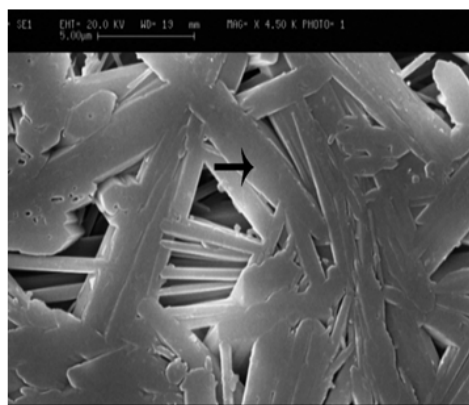
شکل ۳- تصویر SEM نمونه ژئیس خالص (سمت چپ) به همراه الگوی EDXA مطابق آن (سمت راست)



شکل ۴- تصویر SEM نمونه G-Sr<sup>۱</sup> (سمت چپ) به همراه الگوی EDXA مطابق آن (سمت راست)

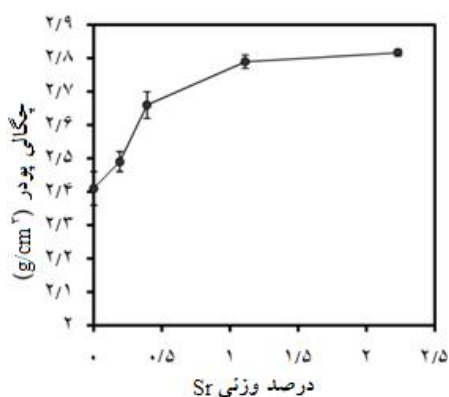


شکل ۵- تصویر SEM نمونه G-Sr<sup>۲</sup> (سمت چپ) به همراه الگوی EDXA مطابق آن (سمت راست)

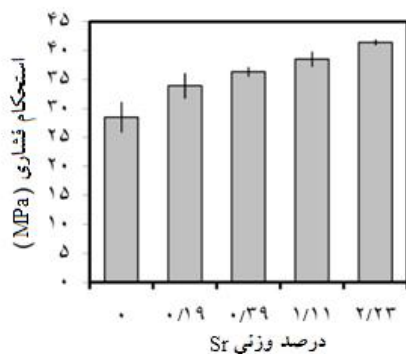


شکل ۶- تصویر SEM نمونه G-Sr<sup>۴</sup> (سمت چپ) به همراه الگوی EDXA مطابق آن (سمت راست)

در هم قفل شده و تراکم ریزساختار است. بنابراین اختلاف در ریزساختار نمونه‌ها، کم بودن استحکام فشاری ژپیس نسبت به Sr-ژپیس را توجیه می‌کند. شایان ذکر است بلورهای ضخیم و بلند Sr-ژپیس به صورت تنگاتنگی در یکدیگر قفل شده‌اند (شکل‌های ۴ تا ۶).



شکل ۷- چگالی پودر نمونه‌های ژپیس با غلظت‌های مختلف Sr وارد شده



شکل ۸- استحکام فشاری نمونه‌های ژپیس با غلظت‌های مختلف Sr وارد شده

در این تصاویر، الگوهای EDXA گرفته شده از یک بلور میله‌ای شکل علامت‌گذاری شده با پیکان، حضور عنصر استرانسیم وارد شده در ترکیب ژپیس را آشکار می‌کند و همچنین روشی تکمیلیست که وارد شدن یون‌های استرانسیم به درون ساختار ژپیس را اثبات می‌کند.

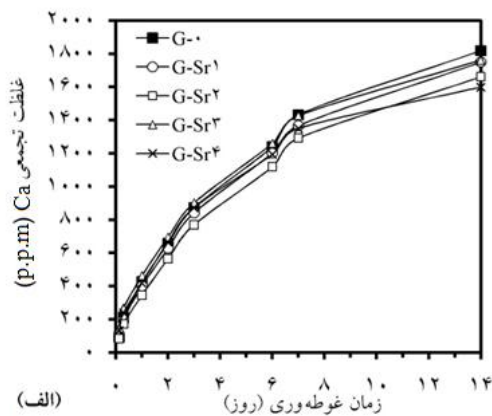
شکل ۷ اثر وارد شدن یون‌های Sr<sup>+2</sup> به درون ژپیس روی چگالی را نشان می‌دهد. با وارد کردن Sr به درون شبکه بلوری ژپیس در چگالی آن افزایش مشاهده شد که این افزایش وابسته به غلظت Sr است و اختلاف‌ها به طور آماری قابل توجه است ( $P < 0/05$ ). چگالی بالاتر پودر ژپیس حاوی Sr در مقایسه با ژپیس خالص به دلیل وزن اتمی بالاتر Sr ( $87/6 \text{ g/mol}$ ) در مقایسه با Ca ( $40/0 \text{ g/mol}$ ) است.

شکل ۸ استحکام فشاری نمونه‌های ژپیس با مقادیر مختلف استرانسیم را نشان می‌دهد. با توجه به شکل، استحکام فشاری ژپیس خالص به طور قابل ملاحظه‌ای از نمونه‌های حاوی استرانسیم کمتر است و تفاوت چشمگیری در استحکام فشاری نمونه‌های ژپیس با مقادیر مختلف استرانسیم ( $P > 0/05$ ) مشاهده می‌شود. به طور کلی استحکام مکانیکی بدنه‌های سرامیکی به ویژگی‌های ریزساختاری آنها بستگی دارد. در انواع سولفات‌های کلسیم، سخت شونده‌گی و استحکام مکانیکی ناشی از درهم قفل شدگی بلورهای میله‌ای شکل است. این بلورهای میله‌ای از تبدیل سولفات کلسیم نیمه هیدراته به سولفات کلسیم دی هیدراته یا ژپیس، طی یک فرایند حل شدن و رسوب‌دهی حاصل می‌شوند [۲۵]. خواص مکانیکی ژپیس تحت تأثیر اندازه (طول و ضخامت) بلورهای

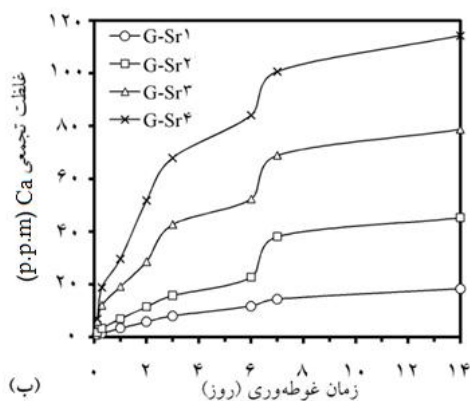


ماده‌ای مناسب برای رهائش استرانسیم، محرک سلول‌های استخوان‌ساز و ترمیم بافت است.

ارتباط مستقیمی بین غلظت یون  $Sr^{+2}$  آزاد شده در SBF و غلظت آن در Sr-ژئوپس وجود دارد. رهائش Sr تجمعی برای  $G-Sr^1$ ،  $G-Sr^2$ ،  $G-Sr^3$  و برای  $G-Sr^4$ ،  $18 \text{ mg/g/L}$  و  $114 \text{ mg/g/L}$  در این بازه ۱۴ روزه محاسبه شد. بر اساس مقدار مؤثر  $Sr^{+2}$  که در محدوده  $2/4-8/75 \text{ mmol/day}$  (برای هر کیلوگرم موش صحرائی) است [۲۹]، سطح یون‌های  $Sr^{+2}$  آزاد شده از Sr-ژئوپس در این مطالعه بیشتر از هیدروکسی آپاتیت جانشین شده با Sr گزارش شده به وسیله لندی<sup>۲۹</sup> و همکاران [۳۰] و قابل مقایسه با  $\beta$ -فسفات تری کلسیم گزارش شده به وسیله آلخرایست<sup>۳۰</sup> و همکاران [۲۶] است. غلظت یون‌های  $Sr^{+2}$  آزاد شده باید در محدوده مجاز باشد زیرا به وسیله مقدار مؤثر این یون‌ها از فعالیت سلول‌های استخوان‌ساز جلوگیری می‌شود.



(الف)



(ب)

شکل ۹- غلظت تجمعی یون‌های Ca (الف) و Sr (ب) آزاد شده از نمونه‌های حاوی استرانسیم متفاوت به درون محلول SBF

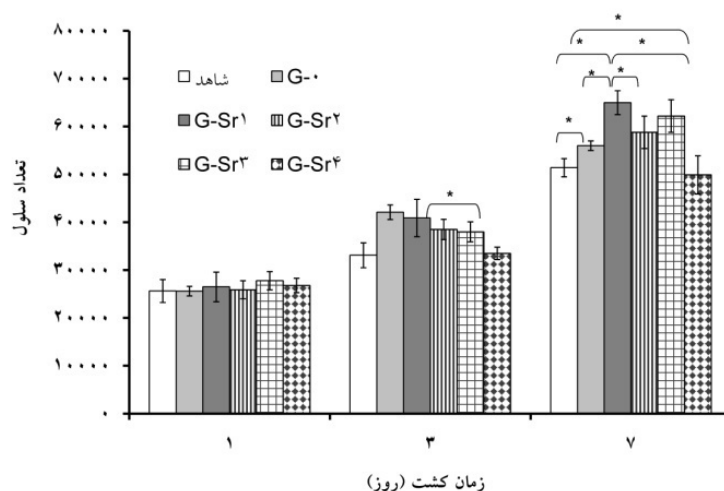
رهائش یون از ژئوپس به درون محلول SBF در شکل ۹ نمایش داده شده است. در این آزمایش محلول SBF به صورت منظم تعویض شد و نتایج به صورت غلظت تجمعی کلسیم (شکل الف-۹) و استرانسیم (شکل ب-۹) بر حسب زمان غوطه‌وری نشان داده شده است. غلظت یون کلسیم آزاد شده از نمونه‌های ژئوپس بیشتر از غلظت یون آزاد شده از فسفات کلسیم‌های گزارش شده در مطالعات دیگر [۲۶] است که این امر ناشی از حلالیت و سرعت جذب مواد پایه کلسیم سولفات‌ی در بدن در مقایسه با دیگر بیوسرامیک‌های شناخته شده از قبیل  $\beta$ -فسفات تری کلسیم و هیدروکسی آپاتیت است. غلظت یون‌های  $Ca^{2+}$  آزاد شده از ژئوپس خالص ( $G-0$ ) به درون محلول SBF به مقدار ناچیزی بیش از نمونه‌های Sr-ژئوپس است. از آنجا که غلظت کلسیم متناسب با نرخ جذب این بیوسرامیک‌ها است، نتایج نشان می‌دهد که مشارکت یون‌های استرانسیم در بدنه ژئوپس می‌تواند نرخ جذب را کاهش دهد. این کاهش رهائش یون کلسیم نمونه‌های Sr-ژئوپس مشخص کننده پایداری شیمیایی بیشتر این مواد در مقایسه با ژئوپس خالص است که در نتیجه حرکت پیچیده یون‌های کلسیم در بلور حین مواجهه با یون‌های استرانسیم (با شعاع اتمی بیشتر در مقایسه با  $Ca^{2+}$ ) و همچنین پیوند قوی‌تر گروه سولفات-Sr در مقایسه با سولفات-Ca است (شایان ذکر است که Sr در مقایسه با Ca الکترون‌گاتیوتر است [۲۷]). بیوسرامیک‌های پایه کلسیم سولفات‌ی به دلیل زیست‌سازگاری کافی و قابلیت تشویق استخوان‌سازی برای احیاء بافت استخوان استفاده می‌شود. مشکل اصلی این مواد نرخ تجزیه بالای آنهاست [۲۸] که به از بین رفتن این مواد، قبل از ترمیم کامل بافت آسیب دیده منجر می‌شود. وارد کردن استرانسیم به درون شبکه ژئوپس می‌تواند نرخ بالای جذب آن را کنترل کند.

علاوه بر آن، نتایج به وضوح رهائش پیوسته یون‌های استرانسیم به درون محیط را نشان می‌دهد پس Sr-ژئوپس

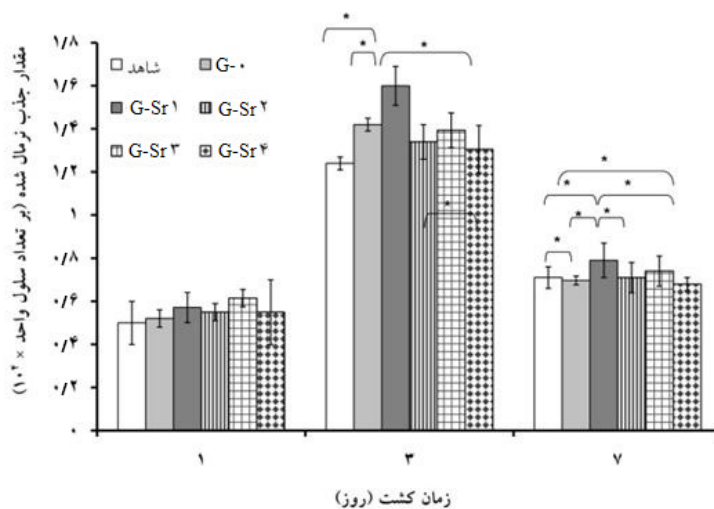
با سرعت قابل توجهی بیشتر از ژئیس خالص تکثیر شدند. اولاً، بر اساس یافته‌های لازاری<sup>۳۱</sup> و همکاران [۲۱]، ساختار فیزیکی ژئیس مکانی مناسب برای تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز روی آن شناخته شد، بدین معنی که سلول‌ها توانستند روی سطح ژئیس بچسبند زیرا ساختار ژئیس به شکل تعداد زیادی بلورهای کوچک میله‌ای و درهم فرورفته است که سطح ویژه بزرگی را فراهم می‌کند. علاوه بر این، اثبات شده است که یون‌های استرانسیم می‌توانند محرک سلول‌ها باشند و متعاقباً نرخ فرایند تشکیل استخوان را افزایش می‌دهند. اثر  $Sr^{+2}$  روی تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز به مقدار آن بستگی دارد که در تطابق با مطالعات دیگر است [۳۱]، به عنوان مثال با افزایش بیش از حد مقدار Sr در نمونه G-Sr۴، نرخ تکثیر سلول‌ها روی آن نمونه نسبت به دیگر نمونه‌های حاوی Sr کاهش یافت.

بیشترین نسبت مولی Sr/Ca در SBF حدود ۰/۰۳ است که با نسبت موجود در اسکلت استخوانی مطابقت دارد [۲۴]. با توجه به نتایج، با تغییر غلظت یون‌های  $Ca^{+2}$  و  $Sr^{+2}$  در بلورهای ژئیس می‌توان رهایش این یون‌ها را در SBF و بنابراین در محیط کشت سلولی را به مقدار مناسب و حد موثر رساند.

شکل ۱۰ نتایج تکثیر سلولی G-۲۹۲ روی نمونه‌های پلی‌استیرین (نمونه شاهد)، ژئیس خالص و ژئیس حاوی استرانسیم را نشان می‌دهد. بعد از اتصال سلولی، از تفاوت در تعداد سلول‌ها بین ۱، ۳ و ۷ روز ( $P < ۰/۰۵$ ) مشاهده شد که سلول‌های استخوان‌ساز روی نمونه‌ها تکثیر شده اند. با توجه به نتایج، تکثیر سلول‌ها بر روی نمونه‌های ژئیس به‌طور قابل توجهی ( $P < ۰/۰۵$ ) بهتر از نمونه‌های شاهد بود و همچنین سلول‌های استخوان‌ساز روی دیسک‌های Sr-ژئیس



شکل ۱۰- تکثیر سلول‌های استخوان‌ساز G-۲۹۲ روی نمونه‌های ژئیس با مقادیر مختلف Sr وارد شده ( $p < ۰/۰۵$ )



شکل ۱۱- فعالیت ALP نرمال شده سلول‌های استخوان‌ساز روی نمونه‌های ژئیس با مقادیر مختلف Sr وارد شده ( $p < ۰/۰۵$ )

<sup>31</sup> Lazary

## مراجع

- [1] Dahl S.G., Allain P., Marie P.J., Mauras Y., Boivin G., Ammann P., Tsouderos Y., Delmas P.D., Christiansen C., Incorporation and distribution of strontium in bone, *Bone* 2001; 28: 446–53.
- [2] Pors Nielsen S., The biological role of strontium, *Bone*, 2004; 35: 583–8.
- [3] Rizzoli R., A new treatment for post-menopausal osteoporosis: strontium ranelate, *J. Endocrinol. Invest.*, 2005; 28: 50–7.
- [4] Marie J.P., Ammann P., Boivin G., Rey C., Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone, *Calcif. Tissue. Int.*, 2001; 69: 121–9.
- [5] Suzuki O., Imaizumi H., Kamakura S., Katagiri T., Bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate and its role in biological mineralization, *Curr. Med. Chem.*, 2008; 15: 305–13.
- [6] Huan Z., Chang J., Calcium-phosphate-silicate composite bone cement: selfsetting properties and in vitro bioactivity, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2009; 20: 833–41.
- [7] Yu T., Ye J., Wang Y., Synthesis and property of a novel calcium phosphate cement, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, 2009; 90: 745–51.
- [8] Bigi A., Foresti M., Gandolfi M., Gazzano M., Roveri N., Isomorphous substitutions in b-tricalcium phosphate: the different effects of zinc and strontium, *J. Inorg. Biochem.*, 1997; 66: 259–65.
- [9] Saint-Jean S.J., Camire C.L., Nevsten P., Hansen S., Ginebra M.P., Study of the reactivity and in vitro bioactivity of Sr-substituted alpha-TCP cements, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2005; 16: 993–1001.
- [10] Li Y.W., Leong J.C.Y., Lu W.W., Luk K.D.K., Cheung K.M.C., Chiu K.Y., Chow S.P., A novel injectable bioactive bone cement for spinal surgery: a developmental and preclinical study, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2000; 52: 164–70.
- [11] Guo D., Xu K., Zhao X., Han Y., Development of a strontium-containing hydroxyapatite bone cement, *Biomaterials*, 2005; 26: 4073–83.
- [12] Cheung K.M.C., Lu W.W., Luk K.D.K., Wong C.T., Chan D., Shen J.X., Qiu G.X., Zheng Z.M., Li C.H., Liu S.L., Chan W.K., Leong J.C., Vertebroplasty by use of a strontium-containing bioactive bone cement, *Spine*, 2005; 30: S84–91.
- [13] Wong C.T., Lu W.W., Chan W.K., Cheung K.M.C., Luk K.D.K., Lu D.S., et al., In vivo cancellous bone remodeling on a strontium-containing hydroxyapatite (Sr-HA) bioactive cement, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2004; 68A: 513–21.
- [14] Xue W., Hosick H.L., Bandyopadhyay A., Bose S., Ding C., Luk K.D.K., Cheung K.M.C., Lue W.W., Preparation and cell-materials interactions of plasma sprayed strontium-containing hydroxyapatite coating, *Surf. Coating Technol.*, 2007; 201: 4685–93.
- [15] Abou Nell E.A., Chrzanowski W., Pickup D.M., O'Dell L.A., Mordan N.J., Newport R.J., Smith M.E., Knowles J.C., Structure and properties of strontium-doped phosphate-based glasses, *J. Roy. Soc. Inter.*, 2009; 6: 435–46.
- [16] Hesaraki S., Alizadeh M., Nazarian H., Sharifi D., Physico-chemical and in vitro biological evaluation of strontium/calcium silicophosphate glass, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2009 (In press, doi: 10.1007/s10856-009-3920-0).

آلکالین فسفاتاز به وسیله سلول‌ها تولید می‌شود و به عنوان شاخص تفکیک کننده سلول‌های استخوان‌ساز به کار می‌رود [۳۲].

فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول‌های استخوان‌ساز به عنوان عدد جذب نرمال شده (بر تعداد سلول واحد) بر حسب زمان کشت در شکل ۱۱ نشان داده شده است. فعالیت ALP مربوط به سلول‌های استخوان‌ساز بر روی نمونه‌های ژئیس به ویژه روی  $G-Sr1$  بهتر از پلی استیرن بود و همچنین، فعالیت ALP بر روی  $G-Sr1$  نسبت به ژئیس بیشتر بود در حالی که اختلاف مقدار ALP بین نمونه ژئیس خالص و دیگر نمونه‌های ژئیس حاوی استرانسیم به طور آماری قابل توجه نبود ( $P>0/05$ ). فعالیت آلکالین فسفاتاز بعد از ۷ روز برای تمامی نمونه‌ها متوقف شد. طبق مطالعات متعددی که انجام شده است یون‌های استرانسیم وارد شده به ترکیب بیوسرامیک‌ها توانستند تکثیر و یا فعالیت آلکالین فسفاتاز سلول‌های استخوان‌ساز را تشویق کنند [۳۳]. در این مطالعه نیز نشان داده شد که حضور یون‌های  $Sr^{+2}$  در ساختار شبکه ژئیس می‌تواند نقش مهمی در تکثیر و فعالیت ALP سلول‌های استخوان ساز  $G-292$  داشته باشد.

## نتیجه‌گیری

بیوسرامیک‌های سولفات کلسیم دی هیدراته (ژئیس) حاوی غلظت‌های مختلف استرانسیم با استحکام فشاری و خواص سلولی بالاتر نسبت به ژئیس خالص حاصل شد. وارد کردن استرانسیم به درون ساختار ژئیس بر روی شکل بلورها و حلالیت آن در محیط اثر می‌گذارد. ژئیس حاوی استرانسیم به عنوان ماده‌ای برای رهایش پیوسته استرانسیم با مقادیری وابسته به غلظت آن در ژئیس مطرح شد. هر دو نرخ تکثیر و فعالیت آلکالین فسفات سلول‌های سرطانی استخوان انسان بر روی  $Sr$ -ژئیس می‌تواند با وارد کردن استرانسیم، بسته به مقدار  $Sr$  در شبکه میزبان، بهبود یابد. همچنین این مشاهدات کاربردهای *in vivo* بهتر ژئیس حاوی استرانسیم را نسبت به ژئیس خالص می‌تواند پیش‌گویی کند که نیاز به بررسی‌های بیشتری دارد.

- [26] Alkhraisat M., Moseke C., Blanco L., Barralet J.E., Lopez-Carbacos E., Gbureck U., Strontium modified bioceramics with zero order release kinetics, *Biomaterials*, 2008; 29: 4691-7.
- [27] Boyd D., Towler M.R., Watts S., Hill R.G., Wren A.W., Clarkin O.M., The role of Sr<sup>2+</sup> on the structure and reactivity of SrO-CaO-ZnO-SiO<sub>2</sub> ionomer glasses, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2008; 19: 953-7.
- [28] Raushmann M.A., Wichelhaus T.A., Stinal V., Dingeldein E., Zichner L., Schnettler R., Alt V., Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections, *Biomaterials*, 2005; 26: 2677-84.
- [29] Marie P.J., Ammann P., Boivin G., Rey C., Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone, *Calcif. Tissue Int.*, 2001; 69: 121-9.
- [30] Landi E., Tampieri A., Celotti G., Sprio S., Sandri M., Logroscino G., Sr-substituted hydroxyapatites for osteoporotic bone replacement, *Acta Biomater.*, 2007; 3: 961-9.
- [31] Xue W., Moore J.L., Hosick H.L., Bose S., Bandyopadhyay A., Lu W.W., et al., Osteoprecursor cell response to strontium-containing hydroxyapatite ceramics, *J. Biomed. Mater. Res.*, 2006; 79A: 804-14.
- [32] Stein G.S., Lian J.B., Owen T.A., Relationship of cell growth to the regulation of tissue-specific gene expression during osteoblast differentiation, *FASEB J*, 1990; 4: 3111-23.
- [33] Kim H.W., Koh Y.H., Kong Y.M., Kang J.G., Kim H.E., Strontium substituted calcium phosphate biphasic ceramics obtained by a powder precipitation method, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, 2004; 15: 1129-34.
- [17] Anson D., Using calcium sulfate in guided tissue regeneration: a recipe for success, *Compend. Contin. Educ. Dent.*, 2000; 21: 365-70.
- [18] Bier S.J., Sinensky M.C., The versatility of calcium sulfate: resolving periodontal challenges, *Compend. Contin. Educ. Dent.*, 1999; 20: 655-61.
- [19] Pecora G., Andreana S., Margarone J.E., Covani U., Sottosanti J.S., Bone regeneration with a calcium sulfate barrier, *Oral. Radiol Endod.*, 1997; 84: 424-9.
- [20] Paderni S., Terzi S., Amendola L., Major bone defect treatment with an osteoconductive bone substitute, *Musculoskelet Surg.*, 2009; 93: 89-96.
- [21] Lazáry A., Balla B., Kósa J.P., Bácsi K., Nagy Z., Takács I., Varga P.P., Speer G., Lakatos P., Effect of gypsum on proliferation and differentiation of MC3T3-E1 mouse osteoblastic cells, *Biomaterials*, 2007; 28: 393-9.
- [22] Kokubo T., Kushitani H., Sakka S., Kitsugi T., Yamamuro T.J., Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic AW, *J. Biomed. Mater. Res.*, 1990; 24: 721-34.
- [23] Hesaraki S., Moztarzadeh F., Nezafati N., Evaluation of a bioceramic-based nanocomposite material for controlled delivery of a non-steroidal anti-inflammatory drug, *Med. Eng. Phys.*, 2009 (In press, doi:10.1016/j.medengphys.2009.07.019).
- [24] Fourman P., Royer P., Levell M., Morgan D.B., Calcium metabolism and the bone, 2nd ed., Oxford: Blackwell, 1968.
- [25] Hesaraki S., Moztarzadeh F., Nemati R., Nezafati N., Preparation and characterization of calcium sulfate-biomimetic apatite nanocomposites for controlled release of antibiotics, *J. Biomed. Mater. Res. B (Appl. Biomater.)*, 2009; 91: 651-61.